改良低温螯合法分离家兔小肠绒毛和隐窝细胞及分离效果鉴定

沈雪梅　李　晶　张　刚　崔宏晓　刘丽慧　姚军虎　徐秀容*

(西北农林科技大学动物科技学院，杨凌 712100)

摘　要：本试验研究家兔小肠绒毛和隐窝细胞的分离方法，为深入研究小肠上皮结构与功能提供体外模型。试验以新西兰白兔为试验材料，在不同螯合剂浓度（5、10、15、20、25 mmol/L EDTA）和螯合温度（4、25 ℃）下分离小肠绒毛和隐窝细胞，检测所分离细胞团的产量、形态、细胞活率、完整性。结果表明：1）各螯合条件下分离的绒毛和隐窝细胞形态完整，基因组 DNA 与总 RNA 完整；2）螯合温度越高且 EDTA 浓度越大时，细胞富集率越高，但对细胞毒害作用也越强，4 ℃、5 mmol/L EDTA 条件下绒毛和隐窝细胞富集率分别为 7.75%和 1.01%，绒毛相对完整率和隐窝细胞相对活率分别为 91.67%和 93.48%；25℃、25 mmol/L EDTA 条件下绒毛和隐窝细胞富集率则分别高达 17.89%和 4.99%，但绒毛相对完整率和隐窝细胞相对活率仅为 4.25%和 5.17%；3）综合分析后确定，4 ℃、10 mmol/L EDTA 条件下分离效果最佳；4）在最佳条件下所分离隐窝富集物的溶菌酶和 α-防御素的相对表达量极显著高于绒毛富集物（P<0.01），显示细胞纯度较高；且隐窝细胞经培养 9 h 后溶菌酶和 α-防御素的相对表达量未发生显著变化（P>0.05），显示细胞依然具有较高活力。由此可见，改良的低温螯合法适用于家兔小肠绒毛和隐窝细胞的高效分离。

关键词：隐窝；绒毛；肠上皮细胞；螯合剂；家兔

中图分类号：R329　　　　　　　　文献标识码：A　　　　　　　　　　文章编号：

小肠是机体消化吸收的重要部位，其功能与肠上皮细胞密切相关，单层柱状上皮细胞覆盖在肠腔组成小肠的上皮，上皮弯曲折叠有序地排列成绒毛和隐窝，其中上皮凸向肠腔形成的叶状结构为绒毛，下陷至固有层形成的指套状结构为隐窝[1]。绒毛和隐窝的细胞组成及生理功能不同，分离培养可用于探讨不同的生理问题，如绒毛培养可用于研究小肠物质吸收、转运等功能[2-4]，隐窝培养则可用于研究肠干细胞生理及潘氏细胞免疫功能等[5-10]。目前国内外分离小肠绒毛和隐窝细胞的方法主要有机械分离法、螯合法、酶消化法[11]，其中螯合法应用最广泛，但螯合法也存在分离时间长、隐窝和绒毛分离效果差、细胞活率低等问题。Pothier 等[12]使用含 1.5 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）的盐溶液在 37 ℃条件下螯合孵育肠组织，分离的绒

收稿日期：2015-12-04

基金项目：陕西省科技攻关项目（2013K02-18）

作者简介：沈雪梅（1990—），女，四川乐山人，硕士研究生，特种经济动物营养调控专业。E-mail: forshenxuemei@163.com

*通信作者：徐秀容，副教授，硕士生导师，E-mail: xuxiurong@nwafu.edu.cn

毛和隐窝细胞互相掺杂，富集率低；Bjerknes 等[13]将 EDTA 浓度提高为 30 mmol/L，虽然分离时间缩短且提高了富集率，但对绒毛损伤很大；Ayabe 等[14]在此基础上将分离温度降低到室温，虽可提高隐窝的完整性，但无法富集绒毛。Flint 等[15]则用二硫苏糖醇（DTT）取代 EDTA 的螯合作用，并将处理温度进一步降低为 4 ℃，可以得到更完整的隐窝细胞团，但对绒毛损伤很大。Fuller 等[16]发现，降低 EDTA 浓度为 3 mmol/L 并结合 2%山梨醇，能有效地降低细胞损伤，但分离时间较长。以上研究均以小鼠或大鼠为试验材料，尚无分离家兔小肠绒毛和隐窝细胞的报道，且不同研究者使用的螯合剂种类、浓度、温度不一致，目前均不能使富集率、完整性、分离纯度、分离时间同时达到理想结果。本研究通过综合分析前人各分离方法的优势与不足，探究不同螯合剂浓度与温度组合对家兔小肠绒毛和隐窝细胞分离效果的影响，筛选出富集率高、细胞活率好、分离时间短的最佳组合，为后续研究家兔小肠不同细胞功能及营养物质吸收及调控机制提供重要手段。

1　材料与方法

1.1 试验设计

以健康 14 日龄新西兰白兔为试验材料。试验采用 2×5 完全随机试验设计，设计 2 个温度水平：4 ℃低温（low temperature,LT）和 25 ℃室温（room temperature,RT）；5 个 EDTA 浓度：5、10、15、20、25 mmol/L。每个处理设 3 个重复，每个重复采用 5 g 小肠组织。

1.2 螯合剂的配制

参照文献[15]配制 D-Hanks 液，额外添加 0.5 mmol/L DTT、100 U/mL 青霉素、100 μg/ mL 链霉素。螯合剂：1.5 mmol/L KCl，96 mmol/L NaCl，8 mmol/L KH_2PO_4，5 mmol/L Na_2PO_4，44 mmol/L 蔗糖，55 mmol/L 山梨糖醇，5 mmol/L 乙二醇二乙醚二胺四乙酸（EGTA），按照试验设计分别添加 5 个浓度的 EDTA。

1.3 小肠绒毛和隐窝细胞的洗脱分离

家兔耳缘静脉注射空气处死后，浸泡于 75%酒精中 3 min，剖腹取下全段小肠，用冰冷的 D-Hanks 液（含 DTT、双抗）冲洗肠腔 3 遍，将肠段外翻并剪成 1~2 cm 小段，洗净黏液，均分 5 g 小肠组织至各处理，各处理加入 50 倍体积（以下各步骤所加螯合剂体积均为 50 倍）对应浓度 EDTA 的螯合剂。LT 组和 RT 组分别在对应温度下操作：1）150 r/min 条件下振摇 15 min 后上下颠倒振摇（≈60 次/min）2 min 后弃悬液，加入螯合剂，相同条件下振摇 5~15 min，至肉眼可见悬液中出现针尖样大小细胞团时弃悬液；2）剩余肠段中加入螯合剂手动上下颠倒振摇 3 min 后，悬液 150×g 离心 3 min 弃上清，此沉淀即为绒毛细胞团；3）剩余肠段中重新加入螯合剂，150 r/min 振摇 5 min 后弃悬液，再加入螯合剂，重复操作 3 次以去除肠壁上的大

部分绒毛；4）重新加入螯合剂，手动轻柔地上下颠倒，每隔 2 min 收集 1 次悬液，并加入新的螯合剂，重复 4 次之后，所得悬液冰上沉淀 2 min，去除下层包含绒毛细胞团的沉淀后，悬液 300×g 离心 5 min 去上清以去除单个细胞，此时获得的沉淀即为隐窝细胞团。

1.4 绒毛与隐窝细胞富集率、绒毛相对完整率与隐窝细胞相对活率测定

在 4 倍光学显微镜视野下观察绒毛和隐窝细胞团的形态和纯度，要求单个 4 倍镜视野下绒毛中隐窝细胞团不多于 3 个，隐窝细胞团内绒毛碎片不多于 3 个[17]。分别测定各处理富集的绒毛和隐窝细胞重量，细胞重量占 5 g 小肠组织的百分比为富集率。将各处理绒毛细胞团稀释到相同倍数后，在单个 4 倍镜视野下统计破损绒毛碎片的数量，每个样品统计 30 个 4 倍镜视野。假定每个 4 倍镜视野下总绒毛数相等，通过公式（绒毛完整率=1－绒毛碎片数/总绒毛数）计算出 1 个 4 倍镜视野下的绒毛完整率，再以其中 1 个处理的绒毛完整率为 100%，相比得到各处理的相对完整率。用台盼兰染色法统计单个隐窝细胞团上死亡细胞数量，每个处理统计 30 个细胞团，按照与绒毛相对完整率相同的算法得到隐窝细胞相对活率。

1.5 基因组 DNA 与总 RNA 提取和电泳

参照试剂盒操作说明，对分离出的绒毛和隐窝细胞进行基因组 DNA 与总 RNA 提取，用以判断细胞核酸完整性，1%琼脂糖凝胶电泳，Biorad 成像仪摄像分析。

1.6 隐窝细胞的培养

富集的隐窝细胞用 DMEM/F-12 培养基清洗 3 次，低速离心去除残余螯合剂后等量接种于细胞培养用 6 孔板，37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱静置培养，分别于 1、3、5、7、9 h 后收集细胞，磷酸盐缓冲液（PBS）清洗 3 次，提取总 RNA 反转录后，实时荧光定量 PCR 检测隐窝细胞相关基因表达的变化。

1.7 实时荧光定量 PCR 方法检测基因表达水平

利用实时荧光定量 PCR 方法检测溶菌酶（*LYZ*）和 α-防御素（*DEFEN*）的表达量，以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（*GAPDH*）为内参基因[18]。根据 GenBank 登录的家兔 *LYZ* 和 *DEFEN* 基因保守区序列设计引物。各基因的扩增引物见表 1。反应体系：10 μL SYBR Premix ExTap^{TM} II (2×)，1 μL PCR Forward Primer (10 μmol/L)，1 μL PCR Reverse Primer (10 μmol/L)，1 μL cDNA，dd H_2O 补至 20 μL。扩增程序：95 ℃预变性 30s；95℃变性 5s，60℃退火 30s，40 个循环。

表 1 各基因实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of genes for real-time qPCR

基因 Genes	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	产物大小 Product size/bp	GenBank 登录号 GenBank accession No.
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 *GAPDH*	F：AGAGCACCAGAGGAGGACG R：TGGGATGGAAACTGTGAAGAG	103	NM_001082253

溶菌酶 *LYZ*	F：GCCGCTACTGGTGTAACGAT R：GATCGCTGACGACCCTCTTT	126	XM_002711323.2
α-防御素 *DEFEN*	F：AGCACTGTTAAGACCGCCAA R：GGAACCTCGTGGCAGATACC	131	XM_008251576.1

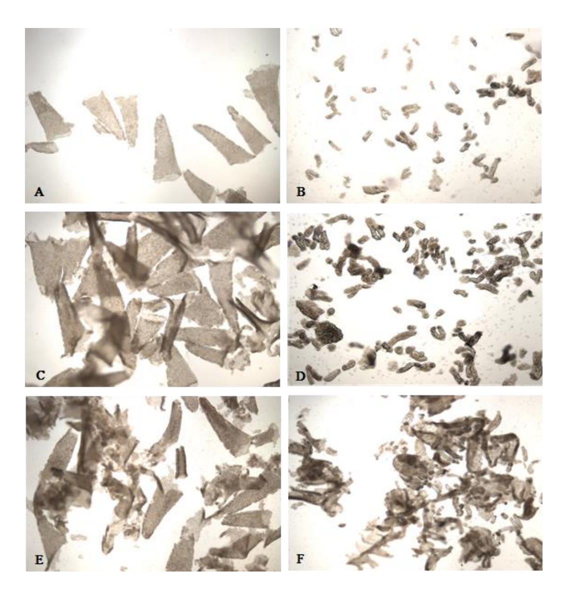
1.8　数据统计分析

数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，表中数据用平均值±标准误表示，*P*<0.05 为差异显著，*P*<0.01 为差异极显著。

2　结果与分析

2.1　绒毛和隐窝细胞团的形态和纯度

在不同 EDTA 浓度和温度下，均获得了较完整的绒毛和隐窝细胞团。操作过程中，第 2 步洗脱绒毛时出现针尖样细胞团所需时间：RT 各组（5~9 min）短于 LT 各组（7~15 min），且 EDTA 浓度越高所需时间越短。第 4 步沉淀隐窝时，LT+5 mmol/L EDTA 组隐窝洗脱量极低，且参杂大量绒毛，2 min 内洗脱物纯化后仅获得 5 mg 左右隐窝细胞团，远远低于 LT+10 mmol/L EDTA 组。在光学显微镜 4 倍镜下观察，LT 较 RT 条件下得到的细胞团形态结构更完整，但富集量小，LT+5 mmol/L EDTA 组细胞团结构最完整，但细胞浓度最低（图 1-A、图 1-B）；随着温度及 EDTA 浓度的升高，得到的细胞团结构完整性逐渐降低，但细胞浓度逐渐升高；在 RT+25 mmol/L EDTA 条件下时，尽管富集量最高，但在绒毛富集物中出现了较多的隐窝，隐窝富集物中也出现了大量绒毛碎片（图 1-E、图 1-F）。直观可看出，在 LT+10~15 mmol/L EDTA 条件下分离效果较好（图 1-C、图 1-D）。



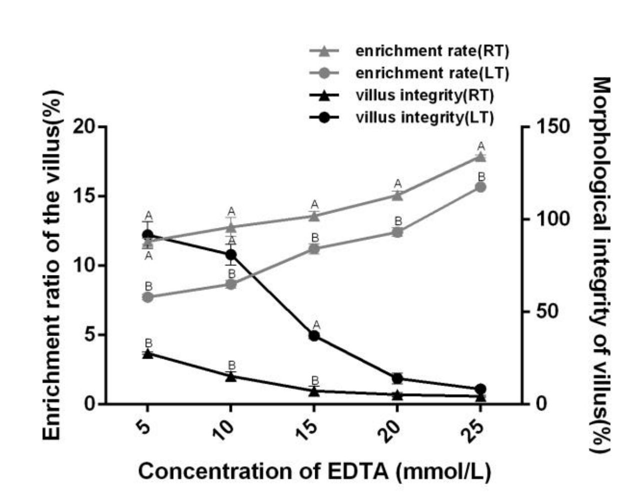
图示 A 与 B、C 与 D、E 与 F 分别为 LT+5 mmol/L EDTA、LT+10 mmol/L EDTA、RT+25 mmol/L EDTA 条件下分离的绒毛与隐窝细胞团的形态。

This picture showed the morphology of separated villus and crypt cells under LT+5 mmol/L EDTA （A and B）, LT+10 mmol/L EDTA （C and D） and RT+25 mmol/L EDTA （E and F）, respectively.

图 1　绒毛和隐窝细胞富集物的形态学观察
Fig.1　Morphological observation of enriched villus and crypt units

2.2　各分离条件对绒毛细胞富集率与绒毛相对完整率的影响

由图 2 可知，各 EDTA 浓度条件下，RT 组绒毛细胞富集率均极显著高于 LT 组（*P*<0.01），且 2 种温度条件下绒毛细胞富集率均随着 EDTA 浓度升高而升高。在 EDTA 浓度小于等于 15 mmol/L 时，LT 组绒毛相对完整率极显著高于 RT 组（*P*<0.01），且随着 EDTA 的浓度升高绒毛相对完整率降低；浓度大于等于 20 mmol/L 时 RT 组与 LT 组绒毛胞相对完整率差异不显著（*P*>0.05）。



同指标同 EDTA 浓度，数据点标注不同大写字母表示差异极显著（*P*<0.01），无字母表示差异不显著(*P*＞0.05)。图 3 同。
In the same index and the same EDTA concentration, value points with different capital letters mean significant difference (*P*<0.01), while with no letter mean no significant difference (*P*＞0.05). The same as Fig.3.
图 2　各分离条件下绒毛细胞富集率与绒毛相对完整率
Fig.2　Villus cell enrichment ratio and villus relative integrity rate under different separated conditions

2.3　各分离条件对隐窝细胞富集率与相对活率的影响

由图 3 可知，各 EDTA 浓度条件下，RT 组隐窝细胞富集率均极显著高于 LT 组（*P*<0.01），且 2 种温度条件下隐窝细胞富集率均随着 EDTA 浓度升高而升高。当 EDTA 浓度小于等于 10 mmol/L 时，LT 组隐窝细胞相对活率极显著高于 RT 组（*P*<0.01），且随着 EDTA 的浓度的升高隐窝细胞相对活率逐渐降低；当 EDTA 浓度大于等于 15 mmol/L 时，LT 组与 RT 组的隐窝细胞相对活率均极低且 2 组间差异不显著（*P*>0.05）。由图可以看出，LT+5~10 mmol/L EDTA 组与 RT+5 mmol/L EDTA 组的隐窝细胞相对活率较高，但 LT+5 mmol/L EDTA 组的隐窝细胞富集率极低（1.01±0.02）%。

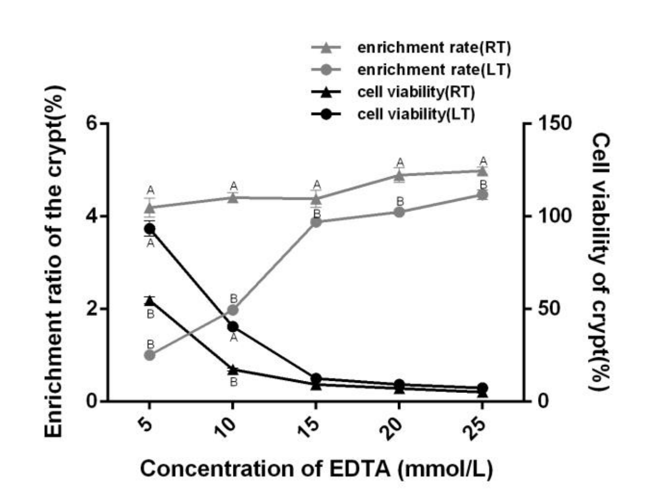
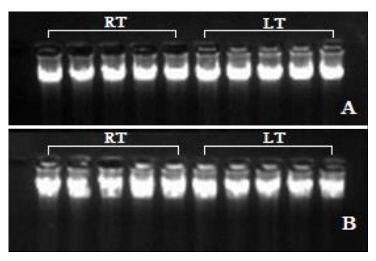


图 3　各分离条件下隐窝细胞富集率与相对活率

Fig.3　Crypt cell enrichment ratio and relative viablity rate under different separated conditions

2.4　绒毛和隐窝细胞基因组 DNA、总 RNA 保存完整性测定结果

富集的细胞团提取 DNA、总 RNA 后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测完整性，结果如图 4 和图 5 所示。各处理条件下，细胞基因组 DNA 完整，未见弥散拖尾现象；总 RNA 可见 28S、18S 和 5S 条带，表明分离过程中细胞处于存活状态。



A 为绒毛细胞，B 为隐窝细胞。RT 与 LT 条件下 EDTA 浓度左起分别为 5、10、15、20、25 mmol/L。图 5 同。

A was villus cell, and B was crypt cell. From left to right, the concentration of EDTA was 5, 10, 15, 20 and 25 mmol/L, respectively. The same as Fig.5.

图 4　绒毛和隐窝细胞富集物基因组 DNA 电泳

Fig.4　Electrophoresis of the genome DNA extracted from crypt and villus enrichments

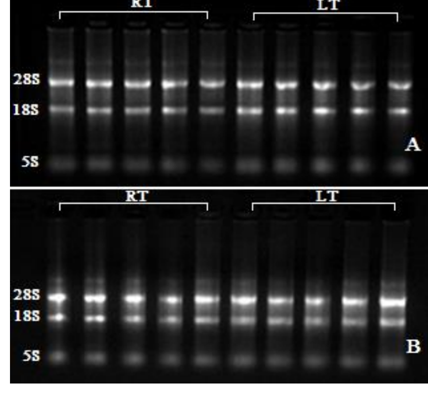


图 5　绒毛和隐窝细胞富集物总 RNA 电泳

Fig.5　Electrophoresis of the total RNA extracted from crypt and villus enrichments

2.5　绒毛和隐窝细胞团差异表达基因检测结果

根据前述的试验结果，选取了综合分离效果最佳的 LT+10 mmol/L EDTA 条件下分离的绒毛和隐窝细胞，检测其 *DEFEN* 与 *LYZ* 的相对表达量，由表 2 可知，隐窝富集物中 *DEFEN* 与 *LYZ* 的相对表达量极显著高于绒毛富集物（P<0.01）。

表 2　绒毛、隐窝富集物 *DEFEN* 与 *LYZ* 的相对表达量

Table 2　Comparisons of *DEFEN* and *LYZ* mRNA expression in villus and crypt enrichments

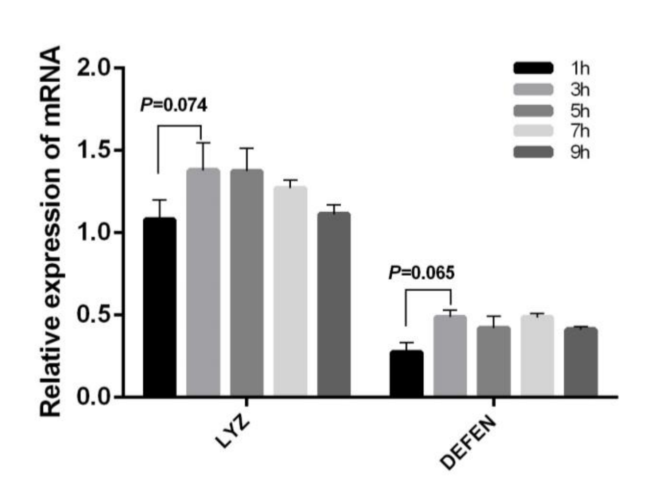
基因 Genes	细胞类型 Cell type	
	绒毛 Villus	隐窝 Crypt
溶菌酶 *LYZ*	0.002 2±0.000 5^{B}	1.477 4±0.137 9^{A}
α-防御素 *DEFEN*	0.000 3±0.000 1^{B}	0.822 6±0.127 6^{A}

同行数据肩标不同大写字母表示差异极显著(P<0.01)。

In the same row, values with different capital letter superscripts mean significant difference (P<0.01).

2.6　隐窝细胞在培养过程中相关基因表达量变化

在 LT+10 mmol/L EDTA 条件下分离的隐窝细胞经培养 1、3、5、7、9 h 后，检测了 *DEFEN* 与 *LYZ* 的相对表达量，结果如图 6。在 1~9 h 过程中，*DEFEN* 与 *LYZ* 的相对表达量均未发生显著变化（P>0.05），但在最初的 1 h *LYZ* 与 *DEFEN* 的相对表达量有低于 3~9 h 时的趋势（0.05<P<0.10）。



数据柱形无字母标注表示差异不显著（P>0.05）。

Value columns with no letter mean no significant difference (P＞0.05).

图 6　隐窝富集物经细胞培养后 *DEFEN* 与 *LYZ* 的相对表达量

Fig.6　Relative expression levels of *DEFEN* and *LYZ* in crypt enrichments

3　讨　论

小肠上皮细胞体外培养是研究肠道相关生理功能的重要手段，相比于各细胞系而言，原代培养的细胞生理性状与体内状态更接近，在一定程度上能较好地反映小肠的真实生理特征[19]。为更深入的研究肠干细胞生理及潘氏细胞免疫等功能，国内外报道了多种绒毛与隐窝细胞分离方法，常用的螯合剂为 EDTA 和 DTT[20]。EDTA 通过螯合作用可以结合并降低组织液中的钙、镁离子，破坏细胞之间的紧密连接，在机械力

的作用下使细胞分离，因此可用于纵向分离肠绒毛与隐窝[21]。DTT 能够破坏分子间的二硫键，迅速地去除黏液及黏附的细菌，达到分离细胞的目的[14]。螯合剂对细胞有一定的毒害作用，其毒性取决于螯合剂种类、浓度、作用温度与时间[22]。动物的年龄、生理状况、肠段大小和肠道紧密连接状态不同，分离条件也所有不同。

根据各成分作用原理，本研究对沿用次数较多的 Flint 等[15]的螯合剂配方进行了改良，除加入一定浓度的 EDTA 外，还加入了 5 mmol/L EGTA，并在清洗肠段时加入 0.5 mmol/L DTT 以快速去除黏液。在分离过程中，使用螯合剂将绒毛和隐窝细胞从小肠组织上分级洗脱下来之后，需要快速去除螯合剂以缩短螯合剂对细胞毒害的时间，且需根据绒毛与隐窝自身沉降系数不同进行富集物的纯化。离心纯化绒毛时须根据试验动物大小确定转速和时间，要求离心力不应过大（$<300\times g$），防止离心力对绒毛结构造成破坏，并能避免将隐窝细胞离心混入绒毛沉淀中[22]。对于较大体型动物的小肠，可使用自然沉降法获得高纯度的绒毛。在隐窝洗脱时不可避免地会混入少量绒毛，需要确定合适的自然沉降时间纯化隐窝细胞。一般以上清液中针尖样大小细胞团即绒毛全部沉入底部时为合理的沉降时间[13]。

本研究结果表明，虽然各分离条件下细胞基因组 DNA 和总 RNA 均保存完整，但在不同条件下分离效果存在显著差异。温度越高，螯合剂浓度越大，得到的富集物越多，但细胞团纯度、绒毛完整性和隐窝细胞活率也越差，甚至会对细胞产生一定毒害作用。首先，高 EDTA 浓度可提高富集率，但同时也是降低隐窝细胞活率和绒毛完整性的主要因素，本研究显示，EDTA 浓度高于 15 mmol/L 时，EDTA 浓度对绒毛完整性和隐窝细胞活率的损伤作用远大于温度，作为后续培养的材料，细胞活率和组织完整性是首要考虑的指标，因此，分离时的 EDTA 浓度不宜高于 15 mmol/L。其次，较高的螯合温度可提高富集率，但同时也会降低绒毛完整性和隐窝细胞活率。对绒毛而言，温度越高绒毛碎片越多，即使在最低 EDTA 浓度条件下，RT 组的绒毛完整性也极显著的低于 LT 组，故分离温度应选择低温；对于隐窝而言，LT+EDTA 浓度低于 10 mmol/L 组和 RT、5 mmol/L EDTA 组的细胞活率均较好，但 LT+5 mmol/L EDTA 组隐窝富集率仅有 (1.01±0.02)%，细胞量已不能满足后续试验要求。综合考虑绒毛和隐窝细胞的分离效果，本研究选择 LT+10 mmol/L EDTA 为最适分离条件。

在小肠上皮细胞中，*DEFEN* 和 *LYZ* 主要在隐窝的潘氏细胞中表达，因而富集物中这 2 个基因的差异表达可以有效说明所富集细胞的纯度和分离效果。本试验结果表明，分离的隐窝富集物中 *DEFEN* 和 *LYZ* 的相对表达量极显著高于绒毛富集物，显示分离的绒毛和隐窝细胞纯度很高，达到预期分离效果。本研究对 LT+10 mmol/L EDTA 条件下分离的隐窝细胞进行了短时间培养以检测是否达到后续研究的要求。培养 3~9 h 过程

中，隐窝细胞中 *DEFEN* 与 *LYZ* 的相对表达量均未发生显著变化，表明培养过程中细胞生理状态稳定；在最初的 1 h，*LYZ* 与 *DEFEN* 的相对表达量有低于 3~9 h 时的趋势，这可能与分离过程中营养物质缺乏及 LT 造成了细胞的饥饿和应激有关，但在随后的培养中得到了恢复。这些结果表明，LT+10 mmol/L EDTA 条件下分离的小肠绒毛和隐窝细胞可以满足后续研究的要求。

4 结 论

① 2 个温度和 5 种 EDTA 浓度条件下对家兔小肠绒毛和隐窝细胞的分离效果有较大差异，低温螯合时细胞富集率较低，但细胞活率较高，螯合剂中 EDTA 浓度越高细胞富集率越高，而细胞活率则相应降低。

② 本研究中，LT+10 mmol/L EDTA 为最佳分离条件，得到的绒毛和隐窝细胞富集率和纯度较高，形态完整，细胞活率高。

③ 在 37 ℃、5% CO_2、无血清的生长培养基中培养 9 h 后的隐窝细胞依然具有较高活力，显示分离的绒毛和隐窝细胞可用于家兔小肠生理特性相关研究。

参考文献：

[1] PETERSON L W,ARTIS D.Intestinal epithelial cells:regulators of barrier function and immune homeostasis[J].Nature Reviews Immunology,2014,14(3):141–153.

[2] HORITA N,TSUCHIYA K,HAYASHI R,et al.Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2014,454(4):493–499.

[3] BEDFORD A,CHEN T,HUYNH E,et al.Epidermal growth factor containing culture supernatant enhances intestine development of early-weaned pigs *in vivo*:potential mechanisms involved[J].Journal of Biotechnology,2015,196–197:9–19.

[4] GRABINGER T,LUKS L,KOSTADINOVA F,et al.*Ex vivo* culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy[J].Cell Death & Disease,2014,5(5):e1228.

[5] VINCENT A,KAZMIERCZAK C,DUCHÊNE B,et al.Cryosectioning the intestinal crypt-villus axis:an *ex vivo* method to study the dynamics of epigenetic modifications from stem cells to differentiated cells[J].Stem Cell Research,2015,14(1):105–113.

[6] BERDASCO M,ESTELLER M.DNA methylation in stem cell renewal and multipotency[J].Stem Cell Research and Therapy,2011,2(5):42.

[7] CLEVERS H.The intestinal crypt,a prototype stem cell compartment[J].Cell,2013,154(2):274–284.

[8] TANCOS Z,NEMES C,POLGAR Z,et al.Generation of rabbit pluripotent stem cell lines[J].Theriogenology,2012,78(8):1774–1786.

[9] BEVINS C L,SALZMAN N H.Paneth cells,antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis[J].Nature Reviews Microbiology,2011,9(5):356–368.

[10] SALZMAN N H.Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome:detente at mucosal surfaces[J].Gut Microbes,2010,1(6):401–406.

[11] EVANS G S,FLINT N,SOMERS A S,et al.The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures[J].Journal of Cell Science,1992,101(Pt 1):219–231.

[12] POTHIER P,HUGON J S.Characterization of isolated villus and crypt cells from the small intestine of the adult mouse[J].Cell and Tissue Research,1980,211(3):405–418.

[13] BJERKNES M,CHENG H.Methods for the isolation of intact epithelium from the mouse intestine[J].The Anatomical Record,1981,199(4):565–574.

[14] AYABE T,SATCHELL D P,WILSON C L,et al.Secretion of microbicidal α-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria[J].Nature Immunology,2000,1(2):113–118.

[15] FLINT N,COVE F L,EVANS G S.A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis[J].Biochemical Journal,1991,280(2):331–334.

[16] FULLER M K,FAULK D M,SUNDARAM N,et al.Intestinal crypts reproducibly expand in culture[J].Journal of Surgical Research,2012,178(1):48–54.

[17] 宁宇,王锋超,刘登群,等.在体分离小鼠小肠隐窝绒毛上皮细胞的生化完整性研究[J].现代生物医学进展,2009,9(14):2610–2612.

[18] 高博,杨晓农,于学辉,等.家兔 *GAPDH* 基因实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J].中国畜牧兽医,2010,37(1):69–73.

[19] GROSSMANN J,WALTHER K,ARTINGER M,et al.Progress on isolation and short-term *ex-vivo* culture of highly purified non-apoptotic human intestinal epithelial cells(IEC)[J].European Journal of Cell Biology,2003,82(5):262–270.

[20] CANO-GAUCI D F,LUALDI J C,OUELLETTE A J,et al.*In vitro* cDNA amplification from individual intestinal crypts:a novel approach to the study of differential gene expression along the crypt-villus axis[J].Experimental Cell Research,1993,208(2):344–349.

[21] CHOUGULE P,HERLENIUS G,HERNANDEZ N M,et al.Isolation and characterization of human primary enterocytes from small intestine using a novel method[J].Scandinavian Journal of Gastroenterology,2012,47(11):1334–1343.

[22] TAUC H M,TASDOGAN A,PANDUR P.Isolating intestinal stem cells from adult *drosophila* midguts by FACS to study stem

cell behavior during aging[J].Journal of Visualized Experiments,2014(94):52223.

Separation of Rabbit Intestinal Villus and Crypt Cells Using Improved Cryogenic Chelating Method and Separation Effect Identification

SHEN Xuemei LI Jing ZHANG Gang CUI Hongxiao LIU Lihui YAO Junhu XU Xiurong*

(*College of Animal Science and Technology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling* 712100, *China*)

Abstract: This study aimed to investigate the separation method of rabbit intestinal villus and crypt cells, which can be served as the *in vitro* model for study on the structure and function of the intestinal epithelium. The experiment used New Zealand white rabbits as test material, and separated their intestinal villus and crypt cells under the conditions of different chelating agent concentrations (5, 10, 15, 20 and 25 mmol/L EDTA) and chelating temperatures (4 and 25 ℃). Then the yield, morphology, cell viability rate and integrity of the separated cells were detected. The results showed as follows: 1) under different chelating separation conditions, all of the collected villus and crypt cells remained morphological integrity, and the genomic DNA and total RNA of these villus and crypt cells were intact. 2) The higher chelating temperature and EDTA concentration was, the greater cell enrichment rate was obtained, but the toxic effect on cell was stronger. The enrichment rate of villus and crypt cells in group LT+5 mmol/L EDTA was 7.75% and 1.01%, and that in group RT+25 mmol/L EDTA was 17.89% and 4.99%, respectively; while the relative integrity rate of villus and relative viability rate of crypt cells in the former group were 91.67% and 93.48%, and were 4.25% and 5.17% in the latter group, respectively. 3) By a comprehensive analysis, the best separation effect was observed under the condition of 4 ℃ and 10 mmol/L EDTA. 4) The relative expression levels of lysozyme and α-defensin genes from crypt enrichment separated under the optimal condition were significantly higher than those of from villus enrichment (P<0.01), and it indicated that cells in a higher purity. In addition, relative expression levels of lysozyme and α-defensin genes from the crypt cell separated under the optimal condition had no significantly change after cultured for 9 h (P>0.05), and it indicated that cells still had a higher vitality after cultured for 9 h. In conclusion, the improved cryogenic chelating method is suitable for separating rabbit intestinal villus and crypt cells effectively.

Key words: crypt; villus; intestine epithelial cell; chelating agents; rabbits

---

*Corresponding author, associate professor, E-mail: xuxiurong@nwafu.edu.cn (责任编辑　菅景颖)